

T S1/5/1-

1/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007467730

WPI Acc No: 1988-101664/198815

XRAM Acc No: C88-045716

**Inhibitor of degranulation of mast cells - comprising Bowman Birk-type
trypsin inhibitor derived from soybean**

Patent Assignee: FUJI OIL CO LTD (FUKO)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 63051335	A	19880304	JP 86196347	A	19860820	198815 B
JP 93086933	B	19931214	JP 86196347	A	19860820	199401

Priority Applications (No Type Date): JP 86196347 A 19860820

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 63051335	A		4		
JP 93086933	B		4	A61K-037/64	Based on patent JP 63051335

Abstract (Basic): JP 63051335 A

An inhibitor for degranulation of mast cells contains, as active component, Bowman Birk type trypsin inhibitor derived from soy bean.

The bowman Birk type trypsin inhibitor (BBI) pref. has mol. wt. of 6,000-8,000 and exists in water soluble fraction of soy bean. BBI is natural or active fragment or modified BBI.

USE/ADVANTAGE - Inhibition of degranulation of mast cells can inhibit allergic reaction. Prod. is a high mol. wt. inhibitor for both chymase and tryptase. Nonspecific incorporation to other cells caused by simple diffusion, which occurs with low mol. wt. substances, is distributed, reducing side effects.

In an example, soy bean whey obtd. in the course of prodn. of soy bean proteins was concn. and the concn. was pptd. with 33-67% acetone. The ppte. was dialysed and subjected to DEAE-Cellulose column and CM-Cellulose column. Purified BBI had more than 95% purity.

0/0

Title Terms: INHIBIT; DE; GRANULE; MAST; CELL; COMPRISE; TYPE; TRYPSIN;
INHIBIT; DERIVATIVE; SOY

Index Terms/Additional Words: INHIBIT; DE; G

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): A61K-037/64

International Patent Class (Additional): A61K-035/78; A61K-037/02

File Segment: CPI

?

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-51335

⑤ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ④ 公開 昭和63年(1988)3月4日
A 61 K 37/02 A B F 8615-4C
// A 61 K 35/78 8413-4C
審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑥ 発明の名称 肥満細胞脱顆粒抑制剤

⑦ 特 願 昭61-196347

⑧ 出 願 昭61(1986)8月20日

⑨ 発 明 者 勝 沼 信 彦 徳島県徳島市名東町3丁目246-2

⑩ 出 願 人 不二製油株式会社 大阪府大阪市南区八幡町6番1

⑪ 代 理 人 弁理士 門 脇 清

明 細 書

1. 発明の名称

肥満細胞脱顆粒抑制剤

2. 特許請求の範囲

- (1) 大豆由来のボウマン-バーク(Bowman Birk)
) 型トリプシンインヒビターを有効成分とする
肥満細胞脱顆粒抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、キマーゼ及びトリプターゼ阻害剤
殊に、肥満細胞脱顆粒抑制剤に関するものであ
る。

(従来技術)

アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、喘
息、蕁麻疹、食物性アレルギー等の、IgE(免疫
グロブリンE)の関与するアレルギー性炎症にお
いて、組織中の肥満細胞(mast cell)が重要な役
割を担っていることは既に明らかにされている

(例えば「感染・アレルギー・免疫病学」、
1978年6月1日医学書院発行参照)。即ち、細胞
表面に結合したIgEに対して抗原が結合すること
により、細胞内顆粒が放出され、その中に含まれ
るヒスタミンやSRS-A等が炎症を成立させる
と考えられている。

一方、勝沼らは、肥満細胞顆粒中にキマーゼ
(Chymase)が存在し、これが肥満細胞の脱顆粒に
必須であると共に、遊離した該酵素がIgGを分解
し好中球遊走因子を作ること明らかにした(
「生化学」第57巻1076頁(1985))。更に勝沼ら
は、キマーゼに対する抗体及びキマーゼ阻害作用
のあるキモスタチン(chymostatin)により脱顆粒
が抑制されることを明らかにしたが、アプロチニ
ン(aprotinin)や α_1 -アンチキモトリプシン(α_1 -
antichymotrypsin)などの分子量8000以上の蛋
白性キマーゼ阻害剤では、その抑制は認め難かつ
た("Biochemistry Int.", 10, pp. 863~871(1985))

[発明が解決しようとする問題点]

本発明者等は更に研究を進める中で、肥満細胞

顆粒中にはキマーゼ以外にも存在するトリプターゼ (Trypsase) が、プロトロンビン (Prothrombin) をトロンビン (Thrombin) に活性化させ得ること、及び該活性化による血液凝固系を介する炎症反応への関与の可能性が重要であるとの知見を得て、これと前記キマーゼに関する実験事実から、肥満細胞顆粒中の二種のプロテアーゼ、即ち、キマーゼ及びトリプターゼに対する阻害が、脱顆粒の抑制、ひいてはアレルギー反応の抑制に有意義であろうとの認識を抱くに至ったが、現在までのところ、両プロテアーゼに対し強力な作用を持つ、殊にキマーゼに対し強い活性を示す高分子性阻害物質は見出されていない。

しかし、仮にかかると高分子性阻害物質を発見することができれば、他の低分子性インヒビターにおけるが如き単純拡散による標的肥満細胞以外の細胞への無差別な細胞内侵入は生じ難いものと想像されるので、調作用の恐れのない安全な医薬品開発への展望が開けるものと推測される。

【発明完成の経過】

ターと共に大豆の水溶性画分中に存在している。因に、これら兩種インヒビターの基本的性質は「Method in Enzymology」19巻853頁 (1970) 及び「タン白質研究の新しい視点 (化学研究を中心として)」共立出版刊 (1982) に記載され、かつそれらの構造も既に判明しているので (Eur. J. Biochem., 32, 417; J. Biochem., 74, 887 (1973)) それの化学的及び生化学的方法による合成や修飾も今日では可能である。従って、ここにいうBB I は、大豆から原始的に得られた天然ボウマンバーク型トリプシンインヒビターのみならず、その活性フラグメント若しくは修飾物又はそれらの化学的又は生化学合成物を包含する概念である。

ところで、天然BB I の調製法としては既に種々の方法が知られており、本発明ではどの方法で作られたものでもよいが、一般的には、大豆、脱脂大豆、大豆ホエーなどを出発原料として、これを水性媒質又は極性有機溶剤 (例えば低級アルコール類若しくは低級脂肪酸ケトン類又はジオキサン等) による抽出、膜分離、等電点沈着、増析等

そこで本発明者らは、従来から種々の高分子性プロテアーゼインヒビターの存在が知られながらも、具体的な生理学的挙動については不明であった植物性プロテアーゼインヒビターに探究の手を進めたところ、ここに大豆由来のボウマンバーク (Bowman Birk) 型トリプシンインヒビターが阿膠素に対し顕著な阻害作用を有すること、及びこのものが肥満細胞顆粒からのIgE誘発によるヒスタミンの放出を効果的に抑制することを発見した。

【問題点を解決するための手段】

本発明は以上の知見を基礎とするものであって、その要旨は大豆由来のボウマンバーク (Bowman Birk) 型トリプシンインヒビターを有効成分とする肥満細胞脱顆粒抑制剤に存する。

ここに、発明の主体である大豆由来のボウマンバーク型トリプシンインヒビター (以下BB I と略す) は、約6千～8千の分子量を有し、他のタイプのトリプシンインヒビターである分子量約2万のクニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビ

による凝縮、分画によって先ず粗精製物の状態にまで予備的に精製した後、この組成物を、更にゲル濾過、イオン交換又は吸着などの精製手段を施すことにより、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動で単一のパターンを示す標品にまで純化することが可能である。しかし実用的には、活性さえ明らかであれば粗製品で充分である。なお、活性のアッセイには、公知の方法、例えばクニッツ (Kunitz) のカゼイン消化法又は合成基質 (例えばN-Benzoylarginine-p-nitroanilide) を利用することができる。なお単一性及び純度の検定には、SDS含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又は高速液体クロマトグラフィーを利用するのがよい。

【作用】

大豆由来のBB I は、肥満細胞より精製したキマーゼ及びトリプターゼを強力に阻止する。この阻害機作は、BB I の分子中のキモトリプシン系及びトリプシン系酵素の活性中心に対する特異的結合作用によるものと理解される。

更に大豆由来の B B I は、肥満細胞からの脱顆粒を抑制する。この作用は、上の両酵素に対する阻害作用の結果と考えられるが、B B I の分子量 (約 8,000) から考えて、この間、細胞膜との界面において何等かの取り込み機構が存在することは確実であろう。

とまれ、上の B B I では、その高分子性から他の低分子性インヒビターにおれるが如き単純拡散による被標的細胞以外の他種細胞中への侵入は生じないと考えられ、事実、標的肥満細胞以外の細胞への影響は現在のところ発見されていない。

以上のように、B B I は肥満細胞に作用してその脱顆粒を抑制するため、アレルギー性疾患に対する有力な薬剤としての効用が展望される。

【実施例】

以下、実施例及び参考例により発明をより具体的に説明するが、例示は当然説明用のものであって、発明思想の限定を意味するものではない。

参考例 1 (B B I の調製例)

低変性脱脂大豆から分離大豆蛋白を製造する過

程泳動及び高速液体クロマトグラフィー (ゲル濾過法) にて測定したところ両者ともに蛋白質中 95% 以上であった。また、B B I の比活性は、Sigma 社製トリプシン「タイプ-XI」(7500~9000 BAEE unit/mg の活性蛋白) 及び合成基質 (N-Benzyl-DL-Arginine-p-nitroanilide: BAPA) を用いた測定で、5~6 unit/mg 蛋白であった (同条件で 2 unit の BAPA を水解するトリプシンの活性を 50% 阻害するとき阻害活性を 1 unit とした。)。参考例 2 (B B I によるプロテアーゼの阻害)

ラット舌より精製したキマーゼ及びラット腹腔内肥満細胞より精製したトリプターゼに対する阻害能は、上記 B B I 及びクニッツ型インヒビターを加え、キマーゼの場合、Suc-Leu-Val-Tyr-NCA (Suc = サクシニル、NCA = 4-メチルクマリル-7-アミド) を基質とし、pH 8.5 において測定し、またトリプターゼの場合は、Boc-Phe-Ser-Arg-NCA (Boc = 第三級ブチロキシカルボニル) を基質として pH 7.5 において測定した。B B I 及びクニッツ型インヒビターの水溶液又はキモスタ

チンで得られる大豆ホエーを濃縮し、この濃縮物 (粗蛋白含量 5.5%) 1 容に対し 0.5 容のアセトンを加えて約 1 時間攪拌後、遠心分離して得られた上清に対し、更に 1.5 容のアセトンを加えて約 1 時間攪拌し、生じた沈殿物を水に対して透析した。この透析液に 1/50 量の 0.5 M 燐酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えて pH 7.0 に調整後、DEAE-セルロースイオン交換カラムに通して、疎脂に吸着させた。次いで、カラムを 0~0.4 M の直線食塩濃度勾配で溶出し、溶出液をフラクションコレクターにより分離し、B B I に富む画分とクニッツ型トリプシンインヒビターに富む画分を得た。

B B I に富む画分は、濃縮、透析後、その pH を 4.0 に調整し、CM-セルロースイオン交換カラムに通し、吸着した B B I を 0~0.15 M の食塩濃度勾配にて溶出し、溶出物を凍結乾燥して精製 B B I を得た。またクニッツ型の画分も、等電沈殿後、凍結乾燥し、精製インヒビターを得た。各標品の純度は、SDS 含有ポリアクリルアミドゲル電

泳 (Chymostatin: (財) 蛋白質研究奨励会) のジメチルスルホキシド溶液をキマーゼ又はトリプターゼに添加し、25℃で 5 分間保温した後、基質溶液を加えた。酵素反応精製物は分光光度計にて測定し、各阻害剤の 50% 阻害率を求めた。結果を下表 1 として示す。

表 1

	キマーゼ	トリプターゼ
B B I	9.2 nM	23.0 μ M
クニッツ型インヒビター	> 100 nM	17.7 μ M
キモスタチン	20 nM	> 100 μ M

上表 1 から明らかな様に、クニッツ型インヒビターのキマーゼに対する阻害能は強くなく、またキモスタチンのトリプターゼに対する阻害能も弱いものであった。B B I のみがキマーゼ及びトリプターゼの双方に対し強い阻害能を示した。これは、従来各種インヒビターも見られない特徴である。

実施例 (B B I による脱顆粒の抑制)

表 2

阻 害 剤	濃 度 (μ M)	ヒスタミン 遊離率(%)
無添加(対照)	—	100
BBI	25	74
〃	100	52
キモスタチン	25	45
α 1-抗キモトリプシン	25	99
ロイペプチン	25	70
アプロチニン	25	121

上表から明らかなように、低分子インヒビターであるキモスタチン及びロイペプチンはヒスタミンの遊離を抑制する効果を示し、特に前者の効果は顕著であった。一方、高分子インヒビターである α 1-抗キモトリプシン及びアプロチニンは、自体キマーゼ抑制効果有するに拘らず、ヒスタミンの遊離を抑制する効果がなく、殊に後者は却ってヒスタミンの遊離を促進した。

以上に対し、BBIは高分子インヒビターであるにも拘らず、ヒスタミンの遊離を効果的に抑制する効果を示した。

雄性ウィスター種ラットに、*Nippostrongylus brasiliensis*の幼虫を皮下接種し、IgE抗体値の上昇したラットの腹腔から肥満細胞を純度95~99%の純度で調製した。

脱顆粒の測定は遊離ヒスタミン量を指標として行った。即ち、1ml当たり 4×10^5 個の肥満細胞を0.1%牛血清アルブミン含有タイロッド液中に浮遊させ、BBI又は他のインヒビターを加えて0~60分間37℃に保温した後、これに150 μ M/mlの抗ラットIgE抗体を加え、37℃10分間内におけるヒスタミンの遊離量を液体クロマトグラフィーにより定量化した。インヒビター無添加の場合の対照を100%とした結果を下表2に示す。

(以下余白)

【発明の効果】

以上、説明した通り、大豆由来のBBIは、肥満細胞中のキマーゼ及びトリプターゼを強く阻害すると共に、該細胞からの脱顆粒を抑制するので、炎症その他、種々のアレルギー症状への適応が期待される。

特許出願人 不二製油株式会社

代理人 弁護士 門 脇 精 一